

УДК 665:664.3

П.О. НЕКРАСОВ, докт. техн. наук, доц., НТУ «ХПІ»,

Ю.М. ПЛАХОТНА, аспірант, НТУ «ХПІ»,

О.П. НЕКРАСОВ, канд. техн. наук, проф., НТУ «ХПІ»

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ ЩОДО ГІДРОЛІТИЧНОГО РОЗЩЕПЛЕННЯ ЖИРІВ

В роботі проведено вибір ліпаз для глибокого гідролізу жиру з метою отримання жирних кислот. В результаті серед низки ферментів найбільш ефективними виявилися зарубіжний фермент Lipozyme TL 100L («Novozymes», Данія) та ензим вітчизняного виробництва Солізім (БПО «Ензим», Україна). Показано, що обрані ліпази однаково ефективні в процесі гідролізу жирів, встановлено діапазони раціональних рН та температури для кожного з вказаних біокаталізаторів.

В работе проведен выбор липаз для глубокого гидролиза жира с целью получения жирных кислот. В результате среди ряда ферментов наиболее эффективными оказались зарубежный фермент Lipozyme TL 100L ("Novozymes", Дания) и энзим отечественного производства Солизим (БПО "Энзим", Украина). Показано, что избранные липазы одинаково эффективны в процессе гидролиза жиров, установлены диапазоны рациональных рН и температуры для каждого из указанных биокатализаторов.

In this paper screening of lipases for deep hydrolysis of fats in order to get free fatty acids was performed. Foreign enzyme Lipozyme TL 100L («Novozymes», Denmark) and domestic catalytic agent Solizimum («Enzyme», Ukraine) were chosen as the most effective among series of lipases. It was shown, that enzymes are equally active for fat hydrolysis, rational pH and temperature ranges for each lipase mentioned were determined.

Сучасний стан українських підприємств характеризується використанням традиційних технологій, які не завжди дозволяють отримувати продукцію, що є конкурентоспроможною на європейському ринку. Одним з таких виробництв в олійно-жировій галузі є одержання жирних кислот (ЖК) методом гідролізу.

Дистильовані ЖК є сировиною для виготовлення туалетного мила, резинотехнічних виробів, бавовняних тканин, емульгаторів, косметичних препаратів та ін. Рідка фракція жирних кислот з вмістом олеїнової кислоти не менше 75 % (олеїн) використовується у виробництві хімічних волокон. Технічна стеаринова кислота (стеарин) знаходить своє застосування при виготовленні автопокривок, фотоплівки, ударостійкого полістиролу, стабілізаторів для полімерів, коротколанцюгові ЖК є ароматизаторами [1, 2].

Поліненасичені жирні кислоти використовуються у медицині та фармацевтиці [3], для виготовлення лікувально-профілактичних препаратів, у дієтичних продуктах [4, 5] та для синтезу олії, збагаченої діацилгліцеридами, та структурованих ліпідів.

Існує декілька способів проведення повного гідролізу жиру: розщеплення під дією кислотних, гетерогенних (оксиди металів) каталізаторів, лужний та безреактивний гідроліз.

Раніше у промисловості широко використовували гідроліз жирів у присутності суміші сірчаної та деяких сульфокислот, які мають поверхнево-активні властивості (реактив Твитчела або контакт Петрова). Застосування цих сумішей кислот дозволяє здійснити процес з великою швидкістю при температурі 100 °С.

На сьогоднішній день в Україні більш популярними є лужний та безреактивний гідроліз. У випадку омилення жиру лугом є необхідність використання кислоти для розкладання мила та нейтралізації надлишку лугу.

Безреактивний процес відбувається при температурі 200 – 225 °С та тиску 2,0 – 2,5 МПа без додавання каталізаторів, при такій температурі джерелом іонів водню і гідроксид-іонів є волога внаслідок підвищеного ступеню дисоціації. Безреактивний гідроліз забезпечує у порівнянні з каталітичним більш високу якість гліцерину і жирних кислот, а також покращує вихід продуктів, але висока температура та тиск не дозволяють отримувати у такий спосіб ненасичені ЖК.

Подолати всі недоліки вищезгаданих технологій можуть процеси з використанням у якості каталізаторів ферментних препаратів. Ферменти, або ензими, являють собою високоспеціалізований клас речовин білкової природи, який використовується живими організмами для здійснення багатьох тисяч взаємопов'язаних хімічних реакцій, включаючи розпад, синтез та взаємоперетворення великої кількості різноманітних хімічних сполук [6]. Не входячи у склад кінцевих продуктів, вони дозволяють значно прискорити перетворення речовин, збільшити вихід готової продукції, підвищити її якість, зекономити енергоресурси та інше [7].

Сьогодні для отримання ферментних препаратів харчового призначення використовують органи та тканини сільськогосподарських тварин, культурні рослини (ананас, соя, папайя, інжир) та спеціальні штами мікроорганізмів.

Ферменти тваринного походження – це в основному побічні продукти м'ясної промисловості, найчастіше з панкреатичної залози [8, 9] або з иб [10],

тобто їх джерело та асортимент обмежені, а технологія трудомістка.

Більш поширеними є ензими рослинного походження, наприклад, з насіння рицини [5, 11] та насіння чорного тмину *Nigella sativa* L. [5]. При використанні останнього для гідролізу олії з бурачника при 40 °C з водою і гексаном збільшували вміст вільної γ -лінолевої кислоти в системі [12]. Однак, порівняно з витратами рослинних матеріалів, кількість вилучених рослинних ферментів дуже мала. До того ж, як і з тваринними ензимами, виникають проблеми рентабельності виробництва.

Найбільше розповсюдження здобули ферменти мікробного походження [7]. Сучасні технології дозволяють вилучити з мікроорганізмів ферменти любого типу з бажаними властивостями, тому більшість досліджень присвячено саме їх використанню.

Ферменти мікроорганізмів мають помірну термостабільність. Ліпаза *Rhizopus niveus* втрачає 40 % активності за півгодини при 50 °C. *Pseudomonas fluorescens* – 40 % за той самий час при 60 °C, *Rhizopus japonicus* – 50 % – при 55 °C. Термостабільність зменшується в мікроводних системах. Для проведення тривалих процесів в таких середовищах ензими іммобілізують на твердих та гелеподібних носіях. Ліпаза *Pseudomonas fluorescens*, яка була іммобілізована на смолі Дауекс MWA-1, зберегла 73 % активності після 160 годин роботи при 60 °C в концентрованому субстраті [13].

Ензими виявляють специфічність до оптичних ізомерів ефірів (стереоспецифічність) позиційну, гліцеридну та жирнокислотну.

За позиційною специфічністю ліпази поділяють на дві групи: позиційно неспецифічні, які вивільняють при гідролізі триацилгліцеринів (ТАГ) жирні кислоти (ЖК) зі всіх трьох позицій та 1,3-специфічні. Прикладами неспецифічних є ліпази *Candida cylindracea*, *Geotrichum Candidum*, *Pseudomonas* sp.; 1,3-специфічні ліпази грибів роду *Rhizopus*, *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica*, а також ліпаза підшлункової залози. У більшості відомих біокаталізаторів гідролізу не відзначено стереоспецифічності, яка відрізняє положення 1 та 3 в ацилгліцеридах. Лише у відношенні ліпази золотистого стафілокока відомо, що вона гідролізує ефірні зв'язки з 3 положення в 10 разів повільніше, ніж з 1 [14].

Жирнокислотна специфічність ферментів виявляється у перевазі до ЖК певної довжини ланцюга. В цілому ліпази легко вивільняють ЖК середньої довжини. Це характерно для ензимів мікроскопічних грибів за винятком пеніцилів. Ліпаза *Penicillium roqueforti* віддає перевагу кислотам з коротким ла-

нцюгом та практично не каталізує відщеплення довголанцюгових ЖК. Ліпази *Preudomonas* і *Candida* не обмежені в специфічності по відношенню до довголанцюгових ЖК, а *Geotrichum candidum* специфічна до довголанцюгових ЖК, в яких є цис-подвійні зв'язки в омега-9 позиції, як олеїнова, лінолева, ліноленова та ін. [15].

Ацилгліцерінова специфічність виявлена не у всіх ліпаз. Фермент із *Penicillium cyclosporum* I гідролізує МАГ і ДАГ та практично не діє на триацилгліцерини, в той час як *Penicillium cyclosporum* II атакує всі зв'язки у триацилгліцерині [16].

Світовими лідерами у виробництві ферментів є Данія, Нідерланди та Фінляндія. В Україні існує порівняно небагато підприємств з випуску ензимів. Один з них знаходиться у м. Ладижині, де випускаються ліпази Ліполактин (продуцент – грибна культура *Oospora lactis*) та Солізім (продуцентом є *Penicillium solitum*).

На сьогоднішній день недостатньо комплексних даних щодо ефективності використання ензимів вітчизняного виробництва у порівнянні з відомими закордонними аналогами.

Метою роботи був вибір найбільш ефективної ліпази для проведення гідролізу жиру, який спрямовано на отримання максимального виходу жирних кислот.

Для дослідження було обрано доступні на українському ринку промислові біокаталізатори: 4 ліполітичних фермента датської фірми Novozymes: Lipozyme TL 100L (продуцентом є мікроорганізм *Thermomyces lanuginosus*), Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei*), Lecitase Ultra (*Thermomyces lanuginosus* та *Fusarium oxysporum*), Lipozyme CALB L (*Aspergillus niger*) та вітчизняний ферментний препарат Солізім (*Penicillium solitum*).

На швидкість біокаталітичного гідролізу жирів суттєво впливає активність ферменту. Вона може змінюватися залежно від умов середовища. Зокрема, для ферментних процесів характерні зони температурного та рН оптимумів, тобто при значеннях вказаних параметрів більше або менше оптимальних активність ензимів знижується.

Експерименти було проведено при варіюванні значень рН в інтервалі 5 – 9 та температури у межах 20 – 80 °С. Мольне співвідношення води до жиру (використовувалась соняшникова олія) було однаковим в усіх дослідженнях 25 : 1, тривалість процесу 1 година, вміст ферментного препарату 10 % від маси жиру. Зупиняли реакцію термічною інактивацією ферменту.

Кількісно ефективність ензиму характеризували за ступенем гідролізу, тобто вмістом вільних жирних кислот у розщепленому жирі, що виражається у відсотках та розраховується за формулою [17]:

$$CG = \frac{KЧ}{ЧО} \cdot 100,$$

де $KЧ$ – кислотне число зразка, мг КОН/г, $ЧО$ – число омилення вихідного жиру, мг КОН/г.

За результат приймали середнє арифметичне значення трьох паралельних вимірювань. Отримані дані представлено на рисунках 1 – 5.

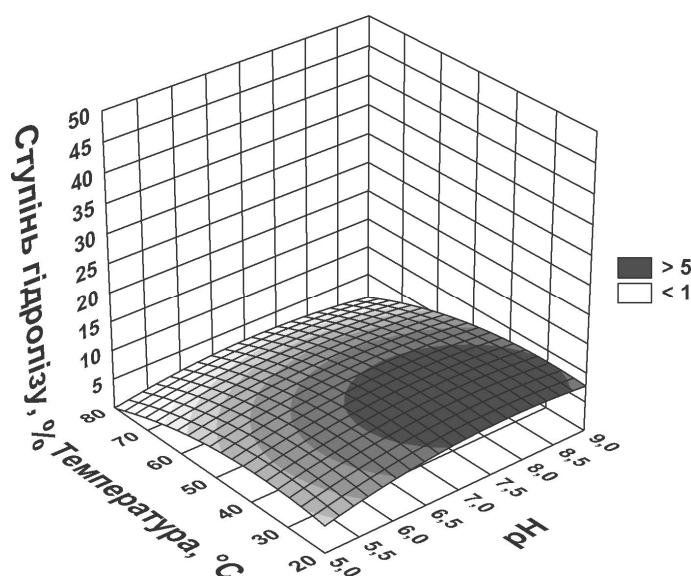


Рис. 1. Гідроліз жиру під дією ферменту Lipozyme CALB L

Результати, представлені на рис. 1, свідчать про те, що ліпаза Lipozyme CALB L не є ефективним каталізатором процесу гідролізу жирів і дозволяє отримати лише невисокий ступінь розщеплення жиру (не більш 9 %).

Як видно з графіку, представленому на рис. 2, ефективність ліпази Lipozyme RM IM незначно перевищує рівень попереднього ферменту Lipozyme CALB L (ступінь гідролізу жиру знаходиться в межах 17 – 18 %).

В той же час застосування ферментного препарату Lecitase Ultra дозволяє поглибити ступінь розщеплення жиру майже вдвічі: в умовах експерименту вказаний показник становить більше 30 % (рис. 3).

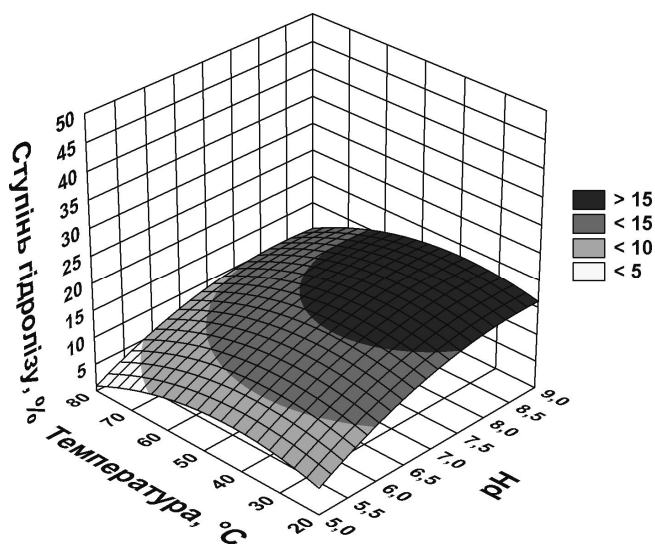


Рис. 2. Гідроліз жиру під дією ферменту Lipozyme RM IM

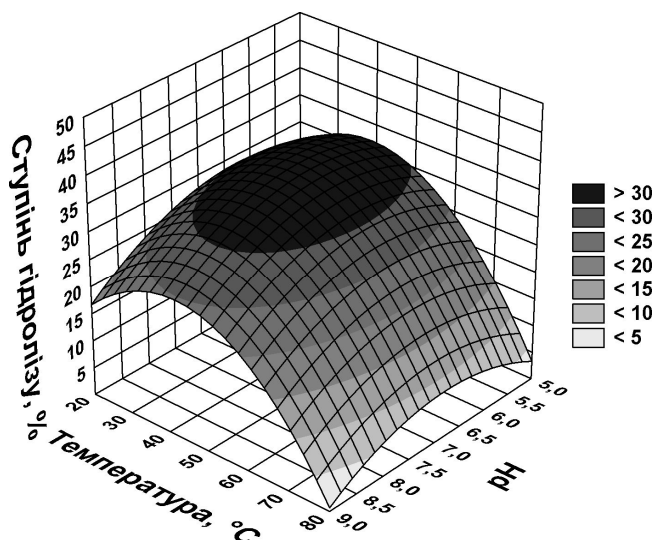


Рис. 3. Гідроліз жиру під дією ферменту Lecitase Ultra

Аналіз результатів дослідження, наведених на рис. 4, вказує на те, що у випадку застосування фермента Lipozyme TL 100L ступінь гідролізу складає більш 40 %. Вказаний фермент проявляє найбільшу активність в таких умовах: температура 40 – 60 °C, pH 7 – 8,5.

Результати досліджень, представлені на рис. 5, свідчать про те, що ліпаза Солізім (*Penicillium solitum*) дозволяє в умовах експерименту досягти ступеня гідролізу також більше 40 %.

Проте раціональні межі температури та pH при застосуванні вказаної ліпази відрізняються від Lipozyme TL 100L та становлять відповідно 20 – 35 °C та 6,5 – 7,5.

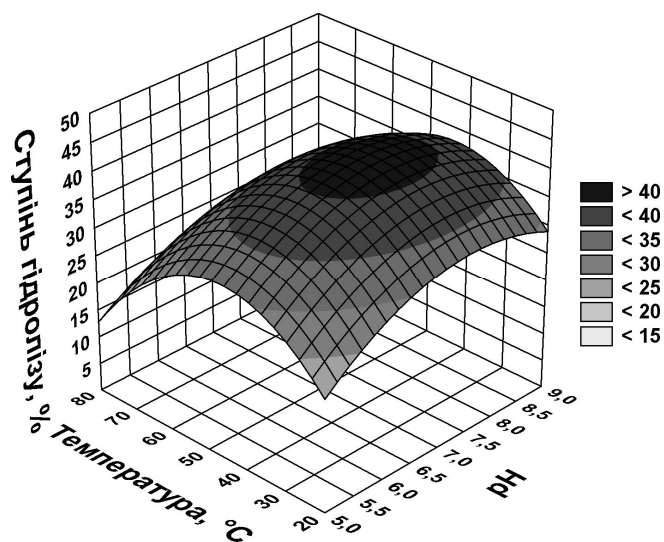


Рис. 4. Гідроліз жиру під дією ферменту Lipozyme TL 100L

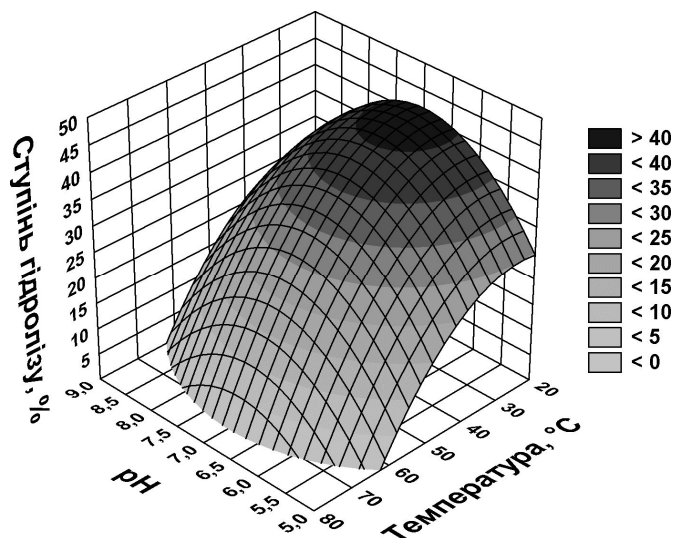


Рис. 5. Гідроліз жиру під дією ферменту Солізім

Таким чином, аналіз отриманих даних свідчить про те, що серед усіх досліджуваних ферментів найбільш ефективними виявились ліпази Lipozyme TL 100L (*Thermomyces lanuginosus*) та Солізім (*Penicillium solitum*). Перевагою препарату вітчизняного виробництва є помірна ціна та висока каталітична активність. В той же час вказаний препарат є досить термолабільним, інактивація відбувається вже при 45 – 50 °C, що унеможливорює його використання для гідролізу високоплавких жирів. У таких випадках ефективною альтернативою є ліпаза з *Thermomyces lanuginosus*, температура денатурації білкової структури якої відбувається при 70 – 75 °C.

Список літератури: 1. Сарафанова Л.А. Пищевые добавки: энциклопедия / Л.А. Сафарова. – [2-е изд.]. – С-Пб: ГИОРД, 2004. – 809 с. 2. Кудрина Г.В. Применение в резинах солей жирных кислот на основе отхода производства растительных масел / Г.В. Кудрина // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 7. – С. 20 – 21. 3. Гаврисюк В.К. Применение Омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в медицине / В.К. Гаврисюк // Укр. пульмон. журн. – 2001. – № 3. – С. 5 – 10. 4. Шеламанова С.А. Использование липолитически расщепленных масел при выработке диетического хлеба / С.А. Шеламанова, Н.М. Дерканосова, Н.В. Янышева // Кондитерское и хлебопекарное производство. – 2003. – № 6. – С. 5 – 12. 5. Melek T. Partial purification of *Nigella sativa* L. seed lipase and its application in hydrolytic reactions. Enrichment of γ -linolenic acid from borage oil / [T. Melek, A.H. Auge, U. Guldem et all.] // JAOCS. – 2003. – Vol. 80, № 3. – P. 237 – 241. 6. Синеокий С. Разработка эффективных продуцентов липаз и новых технологий их использования / С. Синеокий // В мире науки. – 2006. – № 7. – С. 47 – 51. 7. Докучаева Г. Рынок ферментов: в ожидании перемен / Г. Докучаева // Формула Бизнес пищевых ингредиентов. – 2009. – № 2. – С. 15 – 17. 8. Зиновьева М.Е. Гидролиз оливкового масла панкреатической липазой в неводных средах / М.Е. Зиновьева, Н.В. Калачева, В.С. Гамаюрова // Биотехнология. – 1998. – №2. – С. 64 – 67. 9. Barton R. H. ^{13}C Nuclear magnetic resonance characterisation of the reaction products of lamb pregastric lipase catalysed hydrolysis of tributylglycerol / R.H. Barton, C.J. O'Connor // JAOCS. – 1998. – Vol. 75, № 8. – P. 967 – 976. 10. Хасанов Х.Т. Исследование различных липаз для получения продуктов, обогащенных полиеновыми кислотами при гидролизе рыбьего жира / Х.Т. Хасанов, И.Т. Якубов, Л.М. Зпштейн // Прикл. биохимия и микробиология. – 1991. – 27, № 4. – С. 554 – 557. 11. Тютюнников Б.Н. Технология переработки жиров / Б.Н. Тютюнников, Г.Л. Юхновский, А.Л. Маркман. – М.: Пищепромиздат, 1950. – 782 с. 12. Dandik L. The kinetics of hydrolisis of *Nigella sativa* (black cumin) seed oil catalyzed by native lipase in ground seed / L. Dandik, H. A. Aksoy // JAOCS. – 1992. – Vol. 69, № 12. – P. 1239 – 1241. 13. Aehle W. Enzymes in industry: production and applications / Wolfgang Aehle. – Wiley: VCH, 2007. – 489 p. 14. Rastall R.A. Novel Enzyme Technology for Food Applications / R.A. Rastall. – UK: CRC Press, 2007. – 320 p. 15. Дженсон Р. Липолитические ферменты / Р. Дженсон, Х. Брокерхоф. – М.: Мир, 1978. – 396 с. 16. Chahinian H. Kinetic properties of *Penicillium cyclopium* lipases studied with vinyl esters / [H. Chahinian, L. Nini, E. Boitard et all.] // Lipids. – 2000. – Vol. 35, № 8. – P. 919 – 925. 17. Virto M.D. Enzymatic hydrolysis of animal fats in organic solvents at temperatures below their melting points / [M.D. Virto, J.M. Lascaray, R. Solozabal, M. de Renobales] // JAOCS. – 1991. – Vol. 68, № 5. – P. 324 – 327.

Надійшла до редколегії 20.05.11